Standar Nasional Indonesia

SNI 7184.5:2017

Karakteristik limbah Bahan Berbahaya Beracun (B3) – Bagian 5: Pengujian toksisitas akut limbah secara oral pada hewan uji mencit : *up and down procedure*

ICS 13.030.20

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) 7184.5:2017 dengan judul *Karakteristik limbah Bahan Berbahaya Beracun (B3) – Bagian 5: Pengujian toksisitas akut limbah secara oral pada hewan uji mencit: up and down procedure*, merupakan SNI baru.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 13-03 *Kualitas Lingkungan*. Standar ini telah dibahas dan disetujui dalam rapat konsensus di Jakarta, pada tanggal 20 September 2016. Konsensus ini dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu: perwakilan dari produsen, konsumen, pakar, dan pemerintah.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat dari tanggal 15 November 2016 sampai dengan 15 Januari 2017, dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari dokumen standar ini dapat berupa hak paten. Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab untuk pengidentifikasian salah satu atau seluruh hak paten yang ada.

Karakteristik limbah Bahan Berbahaya Beracun (B3) – Bagian 5: Pengujian toksisitas akut limbah secara oral pada hewan uji mencit: *up and down procedure*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode pengujian untuk mengetahui nilai LD_{50} pada limbah berfasa cair, semi padat, dan padat yang akan digunakan sebagai identifikasi limbah bahan berbahaya dan beracun. Pengujian ini dilakukan secara oral dengan *up and down procedure* pada mencit selama 7 (tujuh) hari pengujian dengan dosis tertinggi 5.000 mg/kg berat badan mencit.

2 Acuan normatif

- *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook.* 2002
- *AAALAC Guideline for Animal in Research.* 2011
- *Organization for Economic Cooperation & Development (OECD) 425 (Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure)* 2008.

3 Istilah dan definisi

Untuk keperluan penggunaan Standar ini, berlaku istilah dan definisi berikut:

3.1
toksisitas akut oral
efek merugikan yang terjadi setelah pemberian dosis tunggal atau lebih limbah secara oral dalam waktu 48 jam

3.2
***Lethal Dose* 50 (LD_{50})**
dosis dari suatu limbah yang dapat mematikan 50 % dari populasi hewan uji

3.3
***Reference Toxicant* (RT)**
bahan yang digunakan sebagai acuan pengendalian mutu selama pengujian, contohnya Tembaga (II) Sulfat ($CuSO_4.5H_2O$) (pa)

CATATAN Bahan kimia yang digunakan sebagai RT harus memenuhi persyaratan, yaitu stabil, mudah didapatkan, masih dipergunakan dalam kehidupan sehari-hari, memiliki nilai LD_{50} pada *material safety data sheet* (MSDS), dan pada dosis di bawah 5.000 mg/kg berat badan hewan uji dapat menimbulkan kematian.

3.4
hewan siap uji
hewan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus)* yang sehat dengan galur yang sama, jenis kelamin betina dan tidak pernah dikawinkan, berumur 8 sampai dengan 10 minggu dengan toleransi perbedaan dari berat badan mencit maksimum sebesar 20 % dari rata-rata populasi, disertai surat keterangan sebagai hewan uji

3.5
larutan pembawa (*vehicle for administration)*
bahan yang digunakan untuk membantu membawa contoh uji ke dalam tubuh mencit. Jenis bahan pembawa seperti air bebas mineral, minyak jagung, gum arab 0,05 % atau setipe yang tidak mempengaruhi contoh uji (inert) dan sifatnya mempertahankan contoh uji tetap homogen

CATATAN Jenis larutan pembawa yang digunakan disesuaikan sifat kelarutan contoh uji, volumenya, dan kemudahan ketika di sonde.

3.6
Ad Libitum
persediaan minum selalu tersedia tidak terbatas untuk dikonsumsi mencit

3.7
Bedding
bahan yang digunakan sebagai alas di kandang, seperti hasil serutan kayu

3.8
Maximum Likelihood Method
metode statistik untuk memperoleh ukuran seberapa kuat data mendukung perkiraan LD_{50} atau parameter lainnya. Rasio nilai kemungkinan dapat digunakan untuk membandingkan seberapa baik data mendukung berbagai perkiraan LD_{50}

[Sumber: OECD TG 425]

4 Cara uji

4.1 Prinsip

Pemberian *Reference Toxicant* (RT), contoh uji, dan bahan pembawa (mencit kontrol) ke dalam lambung mencit yang berbeda dilakukan pada hari yang sama dengan memasukkannya secara oral dengan dosis tertentu menggunakan sonde kemudian diamati selama 7 hari.

4.2 Peralatan

Peralatan yang digunakan terdiri atas:

a) sonde oral dengan dimensi 16 g sampai dengan 22s, panjang minimum 36 mm, dan ujung tumpul membulat;
b) *syringe* 1 ml;
c) kandang mencit (minimum luas alas 59 cm^2, tinggi 12,7 cm dengan bahan tahan air, tahan gigit, transparan, tidak berwarna, ringan dan mudah dibersihkan, berbentuk kotak persegi dan penutup jeruji tahan karat);
d) rak kandang mencit;
e) botol minum mencit;
f) sarung tangan;
g) *autoclave*;
h) peralatan gelas (gelas kimia 100 ml, labu ukur 100 ml, labu *erlenmeyer* 100 ml, pipet volumetrik 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 ml; 5 ml);
i) neraca teknis dengan ketelitian 0,1 g;
j) termohigrometer; dan
k) perangkat lunak tertentu untuk menghitung estimasi nilai LD_{50} (lihat Lampiran B).

4.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini terdiri atas:

a) *Reference Toxicant*;
b) air bebas mineral;
c) larutan pembawa (misal air bebas mineral, minyak jagung, atau gum arab);
d) alkohol 70 %;
e) pakan ternak rendah lemak (kandungan lemak maksimum 5 %);
f) *bedding* dengan ketebalan minimum 1,5 cm.

4.4 Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*).

4.5 Persiapan pengujian

4.5.1 Persiapan ruangan pengujian

Kondisikan ruang uji sebagai berikut.

a) atur suhu ruangan pada kisaran 20 °C sampai dengan 25 °C;
b) atur kelembaban ruangan pada kisaran 50 % sampai dengan 80 %;
c) atur pencahayaan pada 12 jam terang dan 12 jam gelap serta lakukan rekayasa pencahayaan agar sesuai dengan karakteristik biologis mencit;
d) catat kondisi suhu dan kelembaban ruangan pada lembar kerja (lihat Lampiran C).

4.5.2 Persiapan mencit (aklimatisasi)

a) lakukan aklimatisasi pada mencit selama minimal 5 hari untuk adaptasi mencit dengan lingkungan yang baru, melihat kondisi fisik mencit, serta meminimalisasi efek stres pada mencit yang dapat mempengaruhi pengujian;
b) selama aklimatisasi kelompok mencit dipisahkan secara bertahap menjadi individual per kandang;

CATATAN Mencit yang sakit segera dipisahkan. Bila ada mencit yang mati, maka lakukan penggantian keseluruhan kelompok mencit.

c) berikan makanan pada setiap ekor mencit dengan takaran 10 % dari berat badan hingga mencapai berat badan yang dipersyaratkan, serta sediakan air minum secara *ad libitum*;
d) timbang berat mencit setiap hari;
e) amati kondisi fisik dan gerakan motorik mencit, jika ditemukan mencit yang sakit dan berperilaku tidak normal pisahkan dari kandang uji;
f) catat hasil penimbangan dan pengamatan pada lembar kerja (lihat Lampiran C).

4.5.3 Persiapan contoh uji

4.5.3.1 Contoh uji berfasa cair dan semi padat

a) aduk contoh uji representatif sampai homogen;
b) timbang contoh uji sesuai dengan perhitungan dosis dan berat tubuh mencit yang telah dipuasakan (lihat 4.6.1 b dan 4.6.2 b);
c) campurkan contoh uji dengan larutan pembawa sampai homogen dan mudah diambil menggunakan syringe.

4.5.3.2 Contoh uji berfasa padat

a) timbang contoh uji representatif sesuai *dengan* perhitungan dosis dan berat tubuh mencit uji yang telah dipuasakan (lihat 4.6.1 b dan 4.6.2 b);
b) campurkan contoh uji dengan larutan pembawa sampai homogen dan mudah diambil menggunakan *syringe*.

CATATAN Tidak diperkenankan penghalusan contoh uji dengan mortar, *crusher*, *ball mill*, atau alat sejenis untuk menghindari perubahan karakteristik contoh uji.

4.6 Prosedur

4.6.1 Penentuan nilai LD50 pada *Reference Toxicant* (RT)

a) pilih satu ekor mencit baru. Catat berat badan awal mencit pada lembar kerja (lihat Lampiran C). Beri tanda pada mencit tersebut sesuai kode analisis. Masukkan mencit ke dalam kandang yang telah berisi *bedding* dan dilengkapi botol minumnya. Satu kandang untuk satu ekor mencit;
b) mencit dipuasakan terlebih dahulu 3 jam sampai dengan 4 jam sebelum diberikan dosis, kemudian berikan perlakuan awal larutan dengan dosis 1,6 kali lebih rendah dari nilai LD_{50} yang tertera pada Material Safety Data Sheet (MSDS), amati;

   CATATAN Jika nilai LD_{50} sudah diketahui, maka untuk menghitung dosis pertama (R1) dilakukan dengan cara membagi nilai LD_{50} dengan angka 1,6 dan dosis kedua (R2) dilakukan dengan cara mengalikan nilai LD_{50} dengan angka 1,6 (angka 1,6 diperoleh dari faktor kenaikan antara dosis sebesar 3,2 yang dibagi 2). Berdasarkan metode *up and* down dari OECD 425, kenaikan antara dosis ditetapkan sebesar 3,2 dari log dosis (slope 0,5) di MSDS RT. (lihat Lampiran D)

c) amati kondisi mencit dalam 48 jam sesuai dengan langkah 4.6.3;

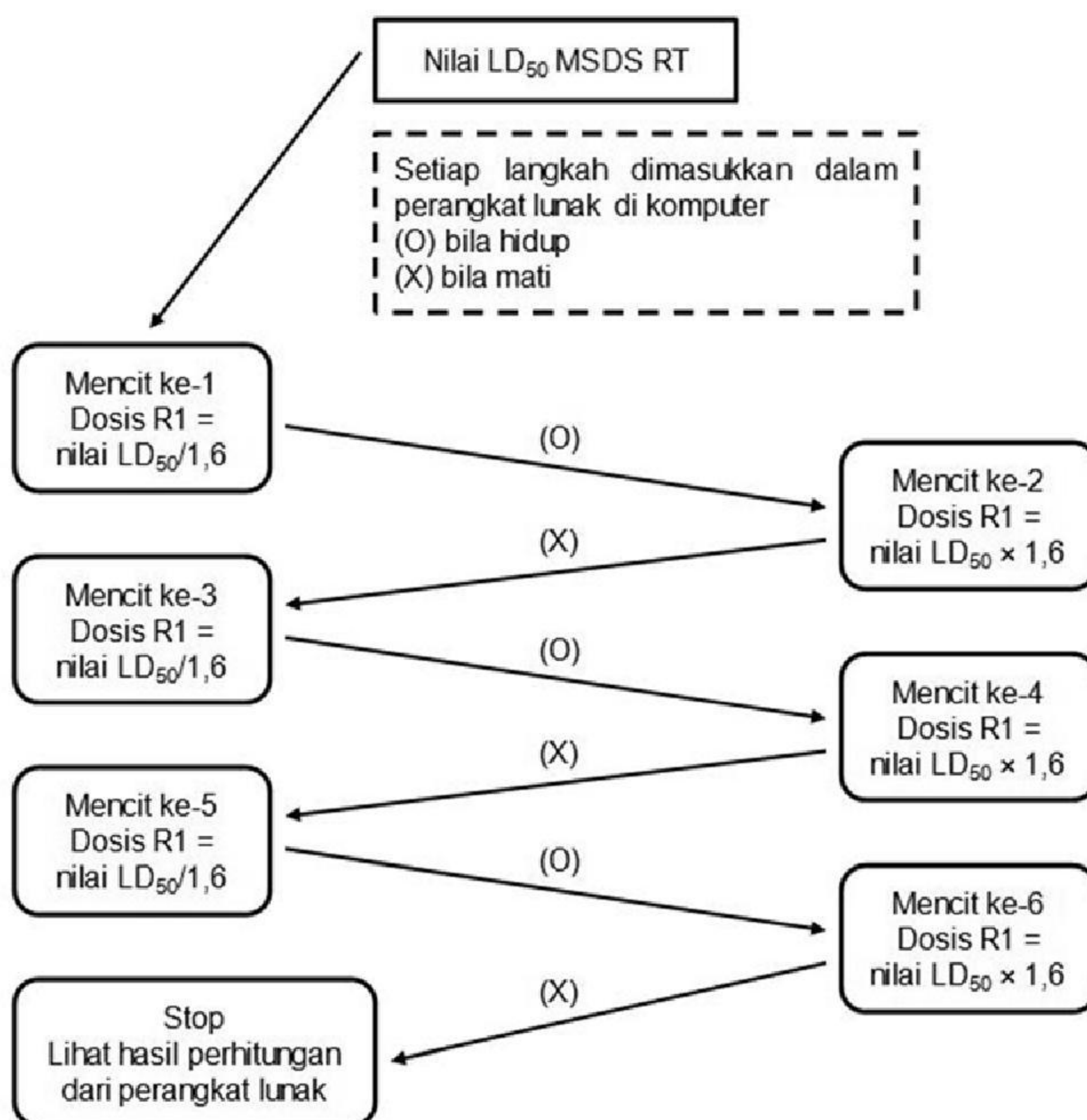
   CATATAN 1 Jika mencit dengan perlakuan awal (R1) mati, maka hentikan pengujian dan lakukan evaluasi terhadap mencit dan larutan RT.

   CATATAN 2 Jika mencit dengan perlakuan awal (R1) hidup, maka ulangi langkah 4.6.1 a) kemudian berikan larutan RT pada mencit (2) dengan dosis 1,6 kali MSDS (R2). Amati kembali kondisi mencit (2) dalam 2 hari sesuai dengan langkah 4.6.3.

   CATATAN 3 Jika mencit (R2) yang diberi perlakuan dosis RT 1,6 kali MSDS hidup, maka hentikan pengujian dan lakukan evaluasi terhadap mencit dan RT.

d) ulangi langkah a) sampai c) dengan maksimum 3 kali pengulangan pada dosis yang sama dengan mencit berbeda (lihat Gambar 1);
e) lakukan langkah a) sampai d) menggunakan larutan pembawa sebagai mencit kontrol, untuk setiap dosis RT yang diberikan;

   CATATAN tidak boleh ada kematian pada kelompok mencit kontrol. Bila kondisi tidak tercapai, pengujian dihentikan dan lakukan evaluasi terhadap mencit.

f) berikan makan mencit setelah 1 jam sampai dengan 2 jam pemberian dosis sesuai butir 4.5.2 c;
g) amati semua mencit yang hidup sampai 7 hari, kemudian setelah selesai pengujian mencit di-*euthanasia* sesuai dengan kaidah kesejahteraan hewan.
h) masukkan hasil pengamatan kedalam perangkat lunak tertentu untuk menentukan kriteria dan estimasi nilai LD_{50} (Lihat Lampiran B).

CATATAN Bila hasil pengujian berbeda maka hentikan dan lakukan evaluasi sesuai 4.6.1 butir (c), catatan 1 sampai dengan catatan 3.

Keterangan gambar:

R1 adalah dosis bawah pengujian untuk RT yang diberikan (1,6 kali lebih rendah dari LD_{50} yang tertera pada MSDS RT);

R2 adalah dosis atas pengujian untuk RT yang diberikan (1,6 kali lebih tinggi dari LD_{50});

Gambar 1 – Diagram Up and Down Procedure untuk Reference Toxicant

4.6.2 Penentuan nilai LD_{50} pada contoh uji

a) pilih satu ekor mencit baru. Catat berat badan awal mencit pada lembar kerja (lihat lampiran C). Beri tanda pada mencit tersebut sesuai kode analisis. Masukkan mencit ke dalam kandang yang telah berisi *bedding* steril dan dilengkapi botol minumnya. Satu kandang untuk satu ekor mencit. Beri tanda kandang sesuai dengan tanda yang tertera pada mencit;
b) mencit dipuasakan dahulu 3 jam sampai dengan 4 jam sebelum diberikan dosis, kemudian berikan contoh uji pada mencit dengan dosis awal 175 mg/kg berat badan mencit
c) berikan makan mencit 1 jam sampai dengan 2 jam setelah pemberian dosis sesuai butir 4.5.2 c.
d) amati kondisi mencit dalam 48 jam sesuai dengan langkah 4.6.3.

CATATAN 1 Jika mencit yang diberi perlakuan dosis contoh uji awal masih hidup, maka ulangi langkah 4.6.2 butir (a) kemudian berikan contoh uji pada mencit baru dengan dosis 3,2 kali dosis awal. Kemudian amati kembali kondisi mencit dalam 48 jam sesuai dengan langkah 4.6.3.

CATATAN 2 Jika mencit yang diberi perlakuan dosis contoh uji awal mati atau sekarat, maka ulangi langkah 4.6.2 butir (a) kemudian berikan contoh uji pada mencit baru dengan dosis yang lebih rendah, yaitu dosis awal dibagi dengan 3,2. Kemudian amati kondisi mencit dalam 48 jam sesuai dengan langkah 4.6.3.

e) Ulangi langkah a) sampai b) kemudian berikan dosis contoh uji mengikuti kondisi mencit dengan perlakuan sebelumnya (bila hidup berikan dosis contoh uji 3,2 kali dosis sebelumnya, bila mati berikan dosis yang diturunkan, yaitu dosis sebelumnya dibagi 3,2) secara berulang hingga memenuhi kriteria;

CATATAN Kriteria pengujian, yaitu:
1) Tiga hewan hidup pada batas atas pengujian (5.000 mg/kg);
2) Tiga hewan uji hidup pada dosis rendah dan 3 kematian pada dosis atas dimulai dari dosis rendah saat ditemukan mencit yang hidup, setelah itu dilakukan uji pada konsentrasi diatas dosis rendah tersebut dan hasilnya mati dan uji pada kedua konsentrasi ini dilakukan sebanyak 2x (*vice versa*);
3) Pengujian dihentikan jika ditemukan 3x kematian pada dosis yang sama (lihat gambar 2);

f) ulangi langkah a) sampai d) menggunakan larutan pembawa sebagai mencit kontrol, untuk setiap dosis contoh uji yang diberikan;

CATATAN tidak boleh ada kematian pada kelompok mencit kontrol. Bila kondisi tidak tercapai, pengujian dihentikan dan lakukan evaluasi.

g) amati semua hewan uji yang hidup setiap hari sampai 7 (tujuh) hari, setelah selesai pengujian mencit di-*euthanasia* sesuai dengan kaidah kesejahteraan hewan;
h) masukkan hasil pengamatan ke dalam perangkat lunak tertentu untuk menentukan kriteria dan estimasi nilai LD_{50} (Lihat Lampiran B).

4.6.3 Pengamatan mencit

Pengamatan mencit dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian *reference toxicant* maupun contoh uji terhadap aktivitas dan gejala toksisitas mencit. Pengamatan ini nantinya akan menjadi data kualitatif.

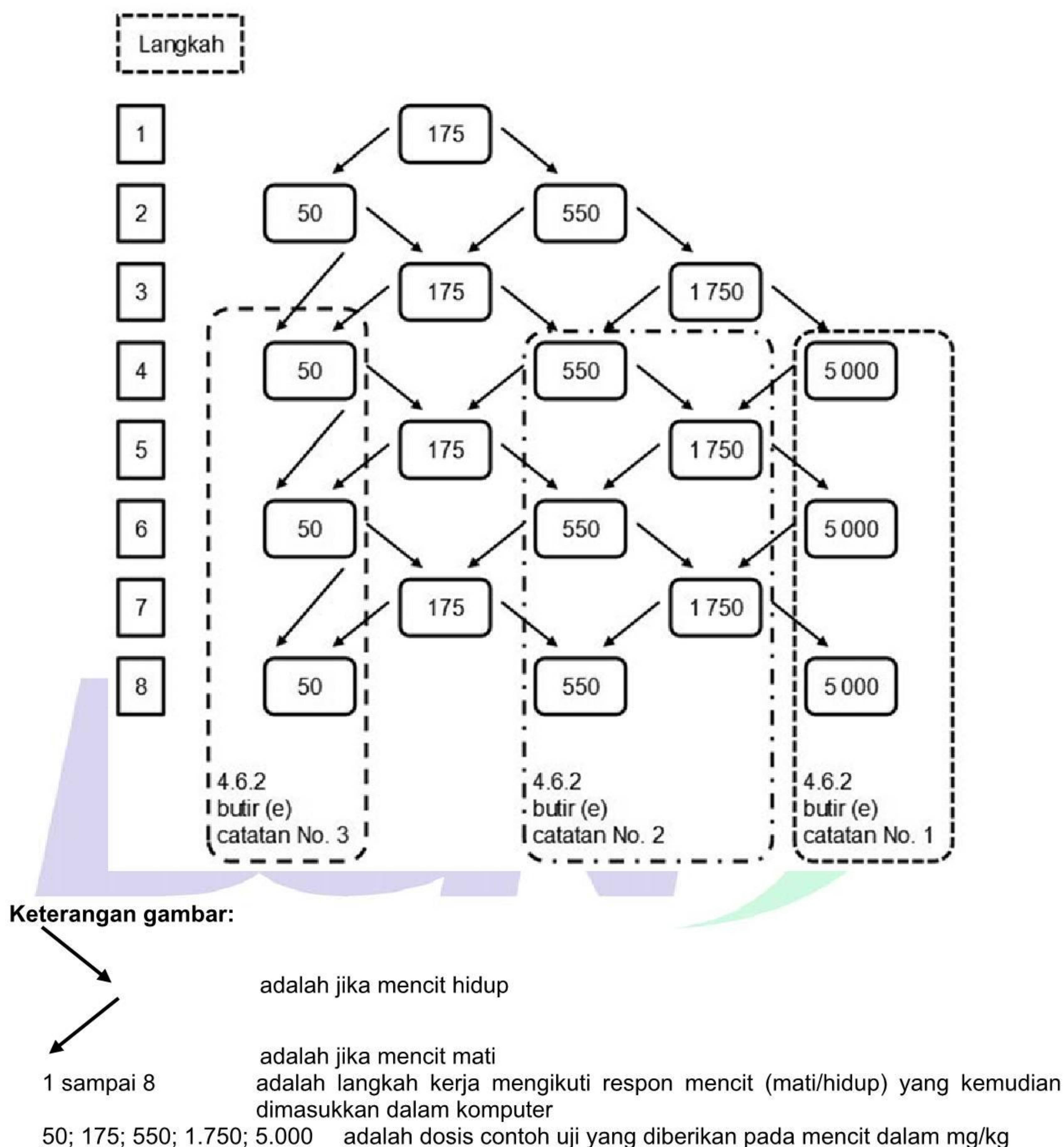
a) lakukan pengamatan secara individual sedikitnya 30 menit sekali dari mulai pemberian perlakuan hingga 4 jam setelah pemberian.
b) lakukan pengamatan setelah 24 jam hingga 7 hari, kecuali jika hewan mati. Mencit dinyatakan sehat berdasarkan pengamatan visual meliputi perubahan fisik, mukosa, gerakan motorik, rangsang syaraf, sirkulasi, pola perilaku, dan tanda keracunan yang muncul.
c) hasil pengamatan dicatat pada lembar kerja (lihat Lampiran C).

Keterangan gambar:

↘ adalah jika mencit hidup

↙ adalah jika mencit mati

1 sampai 8 adalah langkah kerja mengikuti respon mencit (mati/hidup) yang kemudian dimasukkan dalam komputer

50; 175; 550; 1.750; 5.000 adalah dosis contoh uji yang diberikan pada mencit dalam mg/kg

Gambar 2 – Diagram *Up and Down Procedure* untuk Contoh Uji

4.7 Perhitungan

Perhitungan nilai LD_{50} ditentukan secara statistik mengikuti prinsip *maximum likelihood method* (lihat OECD 425). Seluruh data dosis dan respon hewan uji dimasukkan ke dalam perhitungan perangkat lunak tertentu untuk menentukan estimasi nilai LD_{50} (lihat Lampiran B).

5 Pemusnahan limbah

Semua limbah dari pengujian LD_{50}, meliputi mencit, *syringe*, dan limbah lainnya yang digunakan dalam pengujian diangkut dan diolah oleh pihak yang mempunyai ijin operasional

insinerator dari instansi teknis yang bertanggung jawab, sedangkan limbah cair yang dihasilkan selama pengujian dikelola sesuai prosedur yang berlaku.

6 Jaminan mutu dan pengendalian mutu

6.1 Jaminan mutu

a) Gunakan bahan kimia yang pro analisis (pa).
b) Gunakan mencit yang mempunyai silsilah keturunan yang jelas dibuktikan dengan surat keterangan hewan uji.
c) Personil yang melakukan pengujian memiliki keahlian di bidang uji toksisitas akut.

6.2 Pengendalian mutu

a) Tidak boleh ditemukan kematian pada hewan kontrol untuk setiap pengujian.
b) Hasil pengujian LD_{50} dengan *Reference Toxicant* harus sesuai dengan langkah 4.6.1.

Lampiran A
(normatif)
Pelaporan

Dokumentasikan kondisi dan pengamatan hasil pengujian dalam lembar kerja sebagai berikut:

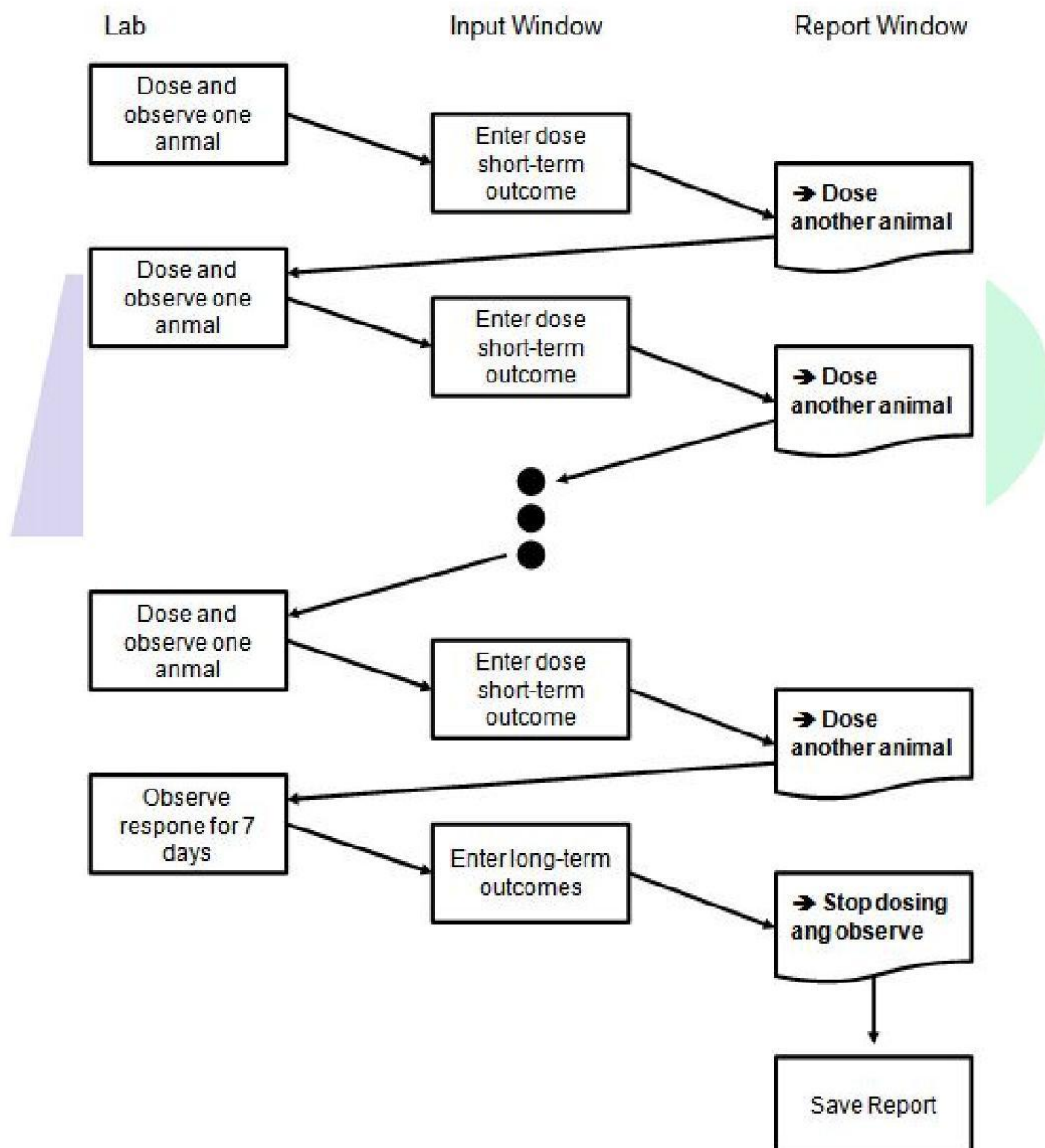
a) Log book kondisi ruangan pengujian lab LD_{50}.
b) Lembar pengamatan mencit selama aklimatisasi.
c) Lembar pengamatan mencit selama pengujian.
d) Lembar kerja analisis LD_{50}

CATATAN Bila hasil pengujian pada dosis 5.000 mg/kg berat badan, respon mencit hidup, maka laporkan nilai LD_{50} > 5.000 mg/kg berat badan.

Lampiran B
(informatif)
Contoh perhitungan estimasi nilai LD_{50}

Perhitungan estimasi nilai LD_{50} dapat menggunakan perangkat lunak yang dikembangkan oleh US EPA, yaitu AOT425StatPgm atau aplikasi pengolah data (*spreadsheet*).

B.1 Perangkat lunak AOT425StatPgm

Alur perhitungan estimasi LD_{50} menggunakan perangkat lunak AOT425StatPgm dapat dilihat pada Gambar B.1. Tampilan menu dasar perangkat lunak AOT425StatPgm dan laporan perhitungan LD_{50} dapat dilihat pada Gambar B.2 dan Gambar B.3.

Gambar B.1 – Diagram alur mekanisme pengujian di AOT425statpgm

Gambar B.2 – Tampilan menu dasar saat melakukan input data pada perangkat lunak AOT425StatPgm

```
AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Monday, May 21, 2001, 9:52:33 AM
Data file name: Case 5 33a 3 dead.dat
Last modified: 5/16/2001 12:05:42 PM

Test/Substance: Example Data.
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 2000
Assumed LD50  (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 1

Recommended dose progression: 2000, 175, 17.5, 1.75

DATA:

Test  Animal     Dose  Short-term  Long-term
Seq.      ID  (mg/kg)      Result     Result

   1       1      175          O          O
   2       2     2000          X          X
   3       3      175          O          O
   4       4     2000          X          X
   5       5      175          O          O
   6       6     2000          O          O
   7       7     2000          X          X
   8       8      175          O          O
   9       9     2000          O          O
  10      10     2000          O          O
  11      11     2000          O          O

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

WARNING:
The data may not be correct
A spacing between doses is not completely consistent with the
assumed sigma

Stopping criteria met: 3 at Limit Dose.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

   Dose        O     X      Total

   175         4     0          4
   2000        4     3          7

All Doses      8     3         11

Statistical Estimate based on long term outcomes:

Estimated LD50 = 2000 (The one dose with partial response).
95% PL Confidence interval is 797.7 to Greater than 20,000.
```


Gambar B.3 – Contoh hasil keluaran dan keterangan

B.2 Aplikasi pengolah data (*spread sheet*)

Stop when LR criterion is first met, here at animal #9.
Check LR criterion starting at animal #6.

Assumed slope	2	sigma =	0.5
Result:	The LR criterion is met		

Parameters of convergence criterion	
critical LR	2.5
factor of LD50	2.5

1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
Step	(I)nclude; (E)xclude	Dose	(X)response (O)non-resp.	Included in nominal *n*	log10 Dose	Contrib.to DAE	LD50 =	1292.8	LD50 =	517.1	LD50 =	3232.0
			OK				Prob. of response	likelihood contribn. (ln *Li*)	Prob. of response	likelihood contribn. (ln *Li*)	Prob. of response	likelihood contribn. (ln *Li*)
1	I	175	O	no	2.2430	0.0000	0.0412	-0.0421	0.1733	-0.1903	0.0057	-0.0057
2	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
3	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
4	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
5	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
6	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
7	I	1750	O	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.9257	0.8552	-1.9323	0.2971	-0.3525
8	I	5000	X	yes	3.6990	3.6990	0.8800	-0.1279	0.9756	-0.0247	0.6477	-0.4344
9	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
10	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
11	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
12	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
13	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
14	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
15	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
Nominal Sample size =				8								
Actual number tested =				9								
Dose-averaging estimator				1292.78								
log10 =				3.112								
log-likelihood sums:								-3.3894		-4.8270		-4.6260
likelihoods:								0.0337		0.0080		0.0098
likelihood ratios:										4.2104		3.4436
Individual ratios exceed critical value?				critical=	2.5					TRUE		TRUE
Both ratios exceed critical value?										TRUE		
Calculated maximum likelihood estimate of LD50 =						1329.6						

Final estimate obtained from Maximum Likelihood Calculations

Gambar B.4 – Contoh estimasi LD_{50} menggunakan aplikasi pengolah data

Urutan penyusunan perhitungan nilai LD_{50} menggunakan aplikasi pengolah data:

a) Tata cara penyusunan data informasi "*dose-respon*" hewan dengan tahapan sebagai berikut:

   1) Pada Kolom 1. Langkah diberi nomor 1-15. Hanya 15 hewan yang dapat dihitung.
   2) Pada Kolom 2. Tempatkan lambang (I) di kolom ini untuk setiap hewan yang diuji.
   3) Pada Kolom 3. Jumlah dosis yang diterima oleh hewan uji.
   4) Pada Kolom 4. Apakah hewan Menunjukkan respons kematian (ditunjukkan oleh X) atau hidup (ditunjukkan oleh O).

b) Ukuran sampel nominal dan aktual

   1) Pada Kolom 5. Memperlihatkan apakah hewan dimasukan dalam sampel nominal, Sampel nominal terdiri dari dua hewan yang mewakili pembalikan (reversal) pertama (contoh pada hewan kedua dan ketiga), ditambah semua hewan yang diuji kemudian.
   2) Ukuran sampel nominal (nominal n) muncul di **baris 16**. Ini adalah jumlah hewan di nominal diuji. Dalam contoh ini, nominal **n** adalah **8**. Jumlah sebenarnya yang diuji muncul di **baris 17** (yaitu 9).

c) Perkiraan kasar dari LD_{50}.

Rata rata geometrik dari dosis untuk hewan dalam sampel nominal digunakan sebagai perkiraan kasar nilai LD_{50} untuk mengukur kenaikan data. Di tabel, ini disebut " *dosis – averaging estimator*" yang diperbarui terhadap setiap binatang yang diuji. Rata-rata ini terbatas pada sampel nominal dalam rangka untuk memungkinkan pilihan yang kasar dari dosis tes awal, yang bisa menghasilkan baik string awal tanggapan atau string awal non - tanggapan. (namun, hasil untuk semua hewan yang digunakan dalam kemungkinan perhitungan untuk perhitungan LD_{50} akhir di letakan bawah). Ingatlah bahwa rata-rata geometris dari angka n adalah produk nomor n, diangkat ke kekuatan 1/n.

Estimasi dosis rata-rata muncul di Baris 18 (misalnya $(550 * 1750* 550* 1750* 550* 1750* 5000* 1750)^{1/8} = 1292,78$).

Baris 19 menunjukkan logaritma (basis 10) dari nilai di baris 18 (misalnya, $\log^{10}$ 1.292,78 = 3,112) .

d) *Likelihood* untuk estimasi LD_{50} kasar.

Likelihood adalah ukuran statistik dari seberapa kuat data mendukung perkiraan LD_{50} atau parameter lainnya. Rasio kemungkinan nilai dapat digunakan untuk membandingkan seberapa baik data mendukung berbagai perkiraan LD_{50}.

Pada kolom 8 menghitung kemungkinan untuk estimasi LD_{50} kasar langkah c). *likelihood* (**Baris 21**) adalah produk dari kontribusi *likelihood* untuk individual hewan uji, kontribusi kemungkinan untuk hewan -i dilambangkan *Li*

Pada kolom 7 memasukkan perkiraan probabilitas respon pada dosis d*i*, dilambangkan *Pi*. *Pi* adalah hasil perhitungan dari kurva dosis - respon. Perhatikan bahwa parameter dari kurva probit dosis - respon adalah kemiringan dan LD_{50}, sehingga diperlukan nilai-nilai untuk masing-masing parameter. Untuk LD_{50} *dosis – averaging estimator* digunakan dari **Baris 18.** Untuk kemiringan dalam contoh ini nilai *default* dari rentang dosis diatas yang digunakan mengikuti langkah-langkah untuk menghitung *P*i respon probabilitas.

1) Menghitung dasar - 10 log dari dosis d*i* (Kolom 6)
2) Untuk masing-masing hewan hitung nilai z-skor, dilambangkan *Zi* (ditampilkan dalam tabel pada kolom 18-21), dengan menggunakan rumus:

   Sigma = 1/slope,
   $Zi = (\log_{10}(di)-\log_{10}(LD_{50}))/sigma$

   CONTOH untuk hewan pertama (baris 1)
   Sigma = ½
   Zi = (2,243-3,112)/0,500= -1,738

3) Untuk dosis ke-I probabilitas estimasi dosisnya adalah:

   Pi = F(Zi)

   Dimana *F* menunjukkan fungsi distribusi kumulatif untuk distribusi normal standar (yaitu, normal distribusi dengan mean 0 dan varians 1)

CONTOH baris 1
Pi = F(-1,738)= 0,0412

Fungsi F (atau sesuatu yang setipe) biasanya diberikan untuk distribusi normal ditabel statistik, tetapi fungsi ini juga banyak tersedia sebagai fungsi spreadsheet @NORMDIST function di Excel.

Untuk mengkonfirmasi bahwa Anda telah menggunakan dengan benar fungsi yang tersedia dalam perangkat lunak Anda, Anda mungkin ingin memverifikasi nilai-nilai umum seperti F(1.96) ≈ 0,975 atau F (1.64) ≈ 0.95.

Pada Kolom 8 Hitung log natural dari kontribusi kemungkinan (ln (L_i)).L_i bentuk sederhana dari probabilitas respon yang benar-benar diamati untuk hewan ke $-_i$:

Respon kematian hewan :
ln(L*i*) = ln (P*i*)

Hewan yang hidup :
ln(L*i*) = ln (1-P*i*)

Perhatikan bahwa di sini digunakan logaritma natural (ln), sedangkan di tempat lain digunakan basis -10 (umum) logaritma. Pilihan ini biasanya digunakan dalam konteks tertentu.

Langkah di atas dilakukan untuk masing-masing hewan, akhirnya:

Pada Baris 20 : Jumlahkan kontribusi log - likelihood di **Kolom 8**.
Pada Baris 21 : Hitung likelihood dengan menerapkan fungsi exp diterapkan pada nilai log -likelihood di baris 20 (contoh EXP(-3,389=$e^{-3.389}$= 0,0337).

e) Menghitung likelihood untuk dua nilai;dosis diatas dan dibawah dari nilai estimasi kasar.

Jika data memungkinkan untuk estimasi yang tepat, maka diharapkan satu nilai *likelihood* harus tinggi dari estimasi perkiraan LD_{50}, terhubung dengan *likelihood* untuk nilai-nilai estimasi yang jauh.

Bandingkan kemungkinan untuk estimasi *dosis - averaging* (1.292,8 , Baris 18) dengan nilai-nilai yang berbeda dengan faktor konstanta 2,5 dari nilai itu (yaitu, untuk 1.292,8*2,5 dan 1.292,8/2,5). Perhitungan (ditampilkan di Kolom 9-12) dilakukan dengan cara yang sama dengan yang dijelaskan di atas, kecuali bahwa nilai-nilai 517,1 (= 1292,8/2,5) Dan 3.232,0 (=1292,8*2,5) yang digunakan untuk LD_{50}, bukan 1.292,8. *The likelihood* dan log – *likelihood* ditampilkan dalam **baris 20-21**.

F. Menghitung Rasio-Likelihood

Tiga nilai kemungkinan (**baris 21**) digunakan untuk menghitung dua rasio-Likelihood (Baris 22). Rasio-Likelihood yang digunakan untuk membandingkan dukungan statistik untuk estimasi 1.292,78 dan dukungan untuk masing-masing dari nilai-nilai 0,517,1 dan 3.232,0. Oleh karena itu dua rasio-Likelihood adalah:

LR1 = [likelihood of 1292.8] / [likelihood of 517.1]
= 0.0337 / 0.0080
= 4.2

LR2 = [likelihood of 1292.8] / [likelihood of 3232.0]
= 0.0337 / 0.0098
= 3.44

f) Menentukan apakah rasio-*Likelihood* melebihi nilai kritis.

Rasio-*Likelihood* yang tinggi diambil untuk menunjukkan dukungan yang relatif tinggi untuk estimasi titik LD_{50}. Kedua Rasio-Likelihood yang dihitung pada langkah F (4.21 dan 3.44) melebihi nilai kritis likelihood-ratio, yaitu 2,5. Oleh karena itu kriteria menghentikan LR terpenuhi dan pengujian berhenti. Hal ini ditunjukkan oleh nilai TRUE di **baris 24** dan catatan di atas contoh spreadsheet bahwa kriteria LR terpenuhi.

Lampiran C
(informatif)
Contoh *log book* dan lembar kerja

C.1 Contoh *log book* kondisi ruangan pengujian lab LD_{50}

Tabel C.1 – Contoh format isian log book kondisi ruangan pengujian lab LD_{50}

LABORATORIUM TOKSIKOLOGI (LD_{50})
RUANG:…………………

TANGGAL	TEMPERATUR (°C)		KELEMBABAN (%)	PARAF PETUGAS	KETERANGAN
	AC	RUANG			

C.2 Contoh lembar kerja pengamatan mencit selama aklimatisasi

Tabel C.2 – Contoh format lembar kerja pengamatan mencit selama aklimatisasi

Lembar Kerja Data Klinis Pengujian Mencit

Sampel No : Dosis : mg/kg
Bahan uji :
Metode : Waktu kematian :
Tanggal mulai :
Tanggal selesai :

Pengamatan	Pengamatan Menit ke									Pengamatan Jam ke:				Pengamatan Hari ke:							Simpulan
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	
Platform																					
Aktivitas motorik																					
Tremor																					
Straub																					
Piloereksi																					
Letargi																					
Diare																					
Grooming																					
Lakrimasi/salivasi																					
Ptosis																					
Fleksi																					
Refleks pineal																					
Refleks kornea																					
Menggelantung																					
Retablismen																					
Berat Badan(g)																					

C.3 Contoh lembar kerja pengamatan mencit selama pengujian

Tabel C.3 – Contoh lembar kerja pengamatan mencit selama pengujian (lanjutan)

Lembar Kerja Data Klinis Pengujian Mencit

Sampel No :

Bahan uji :

Metode :

Tanggal mulai :

Tanggal selesai :

Dosis : mg/kg

Waktu kematian :

Pengamatan	Pengamatan Menit ke									Pengamatan Jam ke:				Pengamatan Hari ke:							Simpulan
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	
Platform																					
Aktivitas motorik																					
Tremor																					
Straub																					
Piloereksi																					
Letargi																					
Diare																					
Grooming																					
Lakrimasi/salivasi																					
Ptosis																					
Fleksi																					
Refleks pineal																					
Refleks kornea																					
Menggelantung																					
Retablismen																					
Berat Badan(g)																					

Tabel C.3 – Contoh lembar kerja pengamatan mencit selama pengujian (lanjutan)

Keterangan tambahan :

kriteria :

normal	:	N
respon negatif	:	-
respon positif	:	+
hiperaktif	:	H
abnormalitas	:	A

Pengamatan :

Platform adalah keadaan posisi tubuh mencit diatas alas pengamatan berjalan dan mengangkat tubuh

Aktivitas motorik adalah aktivitas dan perilaku mencit diatas alas pengamatan dalam kondisi bebas

Tremor adalah gerakan otot yang terjadi secara ritmis dan bolak-balik yang tidak disengaja pada satu atau lebih bagian tubuh

Straub adalah kondisi ekor menjadi tegang walau tidak menerima rangsangan karena gangguan kesetimbangan tubuh

Defekasi adalah tindakan untuk membuang kotoran yang padat atau setengah-padat

Urinasi adalah tindakan untuk membuang cairan melalui saluran kencing

Piloereksi adalah kondisi berdirinya rambut mencit secara tidak wajar

Letargi adalah suatu keadaan di mana terjadi penurunan kesadaran dan pemusatan perhatian serta kesiagaan

Diare merupakan kondisi yang ditandai dengan encernya tinja yang dikeluarkan dengan frekuensi buang air besar yang lebih sering dibandingkan dengan biasanya

Grooming kondisi mencit untuk membersihkan dirinya dan tidak mengalami tekanan

Lakrimasi/salivasi adalah keluarnya cairan dari mata/mulut

Ptosis adalah turunnya kelopak mata atas karena tidak berisitirahat atau kelelahan

Fleksi adalah gerak menekuk atau membengkokkan anggota badan setelah menerima sentuhan

Refleks pineal adalah gerak reaksi telinga setelah menerima sentuhan

Refleks kornea adalah gerak reaksi mata setelah menerima rangsangan cahaya atau sentuhan

Menggelantung adalah kemampuan motorik mencit untuk berpegangan pada batang uji

Retablismen adalah kemampuan motorik mencit untuk berada pada kondisi stabil pada alas setelah dilakukan percobaan menggelantung

C.4 Contoh lembar kerja analisis LD_{50}

Tabel C.4 – Contoh format lembar kerja analisis LD_{50}

LEMBAR KERJA ANALISIS LD_{50}

Parameter	:	Species /Galur Hewan Uji	:
Kode Contoh Uji	:	Jenis Kelamin Hewan Uji	:
Jenis Contoh Uji	:	Umur Hewan Uji	:
Tanggal Penerimaan	:	Berat Hewan Uji	:
Metode	:	Pemberian Makanan	:
Rute Pemberian	:	Pemberian Minuman	:
Tgl Aklimatisasi	:	Reference Toxicant (RT)	:
Tgl Mulai Analisis	:	Keterangan	:
Tgl Selesai Analisis	:	Larutan Pembawa	:

1. Hasil Uji LD50 Contoh Uji:

Mencit	Tanggal analisis	Dosis (mg/kg)	Hasil pengamatan	
			48 jam	7 hari

Keterangan: X = Mati
O = Hidup
Hasil LD50 berdasarkan AOT425StatPgm: **mg/kg bb**

2. Hasil Uji LD50 RT :

Mencit	Tanggal analisis	Dosis (mg/kg)	Hasil pengamatan	
			48 jam	7 hari

Keterangan: X = Mati
O = Hidup
Hasil LD50 berdasarkan AOT425StatPgm: **mg/kg bb**

3. Hasil Uji LD50 Kontrol:

Mencit	Tanggal analisis	Pembawa*	Hasil pengamatan	
			48 jam	7 hari

Keterangan: X = Mati
O = Hidup
Hasil LD50 berdasarkan AOT425StatPgm: **mg /kg bb**

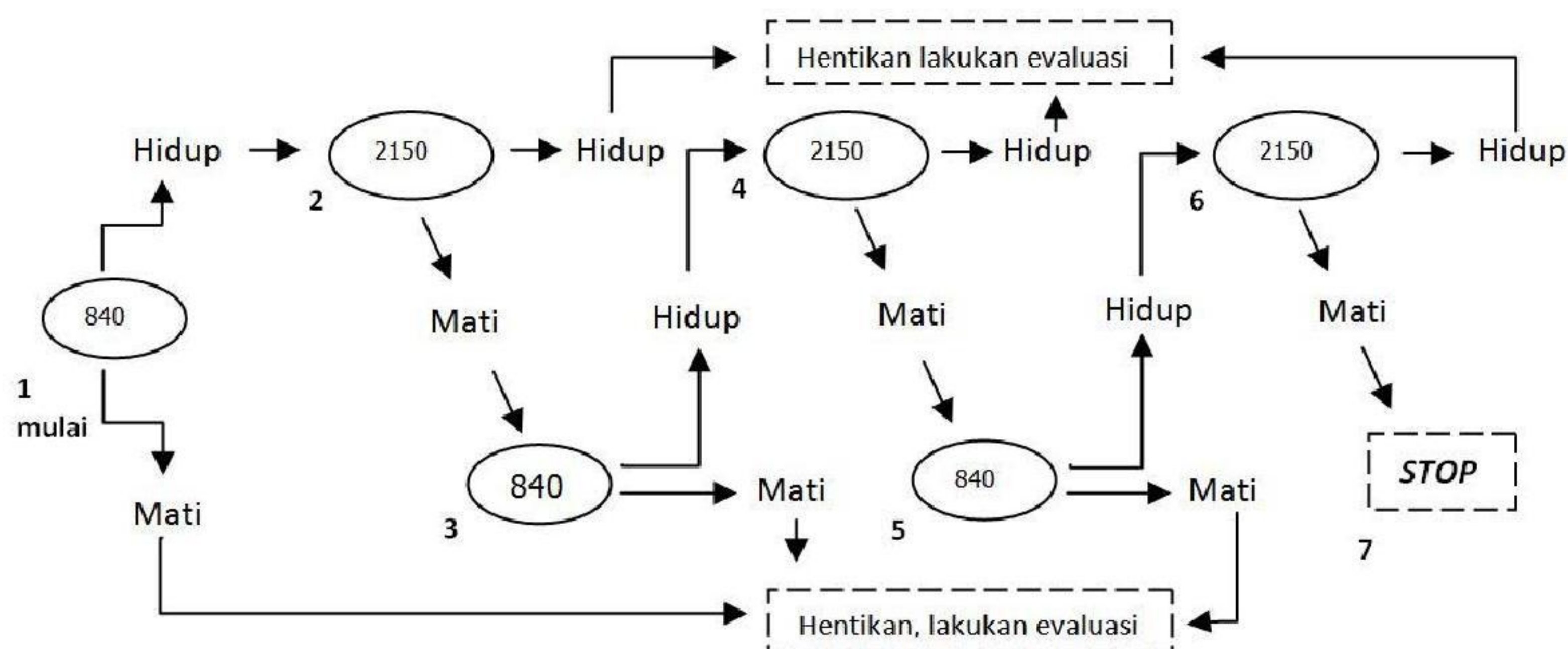
Lampiran D
(informatif)
Contoh perhitungan dosis

Contoh berikut untuk pengujian *Reference Toxicant* menggunakan $CuSO_4$ pada mencit dengan berat badan 20 gram. Berdasarkan MSDS $CuSO_4$ toksisitas akut oral (LD_{50}) terhadap mencit sebesar 1344 mg/kg berat badan mencit. Berdasarkan metode *up and down* dari OECD 425, pengalian antar dosis yang ditetapkan sebesar 3,2 (syarat slope 0,5 log dosis RT). Jika nilai LD_{50} sudah diketahui, maka untuk menghitung dosis pertama dan dosis selanjutnya adalah dengan menaikkan atau menurunkan (*up – down*) dosis dengan cara membagi atau mengalikan nilai LD_{50} pada MSDS dengan 1,6 (faktor pengalian 3,2 dibagi dengan 2). Dosis awal ditetapkan dengan membagi nilai LD_{50} dengan 1,6.

$$\boldsymbol{Dosis\ Awal = Nilai\ LD_{50} \times 1,6 = 1344\ mg/kg \times 1,6 = 840\ \ mg/kg}$$

$$\boldsymbol{Jumlah\ CuSO_4 untuk\ dosis\ awal = Nilai\ dosis\ awal \times berat\ badan\ mencit\ dalam\ kilogram}$$

$$\boldsymbol{Jumlah\ CuSO_4 untuk\ dosis\ awal} = 840\ {}^{mg}/_{kg} \times \frac{20\ gram}{1000\ {}^{gram}/_{kg}}$$

$$\boldsymbol{Jumlah\ CuSO_4 untuk\ dosis\ awal} = 17,6\ mg$$

Gambar D.1 – Contoh diagram perhitungan LD_{50} menggunakan Reference Toxicant $CuSO_4$

Bibliografi

[1] *Organization for Economic Coopera¬tion & Development (OECD) 425 (Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure) 2008*

[2] *Mineral Tolerance of Animals: Second Revised Edition (2005) Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals; Board on Agriculture and Natural Resources; Division on Earth and Life Studies; National Research Council*

[3] *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine Organism; Fifth edition; October 2002; US-EPA*

[4] *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 225 (2013); editor: David M. Whitacre; Springer*

[5] *Material Safety Data Sheet CuSO4.5H2O*

[6] *Acute Oral Toxicity Up and Down Procedure statistical program method 425 http://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/acute-oral-toxicity-and-down-procedure*

Informasi pendukung terkait perumus standar

[1] Komtek perumus SNI
Komite Teknis 13-03 *Kualitas Lingkungan*

[2] Susunan keanggotaan Komtek perumus SNI

Ketua	:	Noer Adi Wardojo
Wakil Ketua		Giri Darminto
Sekretaris	:	Diah Wati Agustayani
Anggota	:	1. Anwar Hadi
		2. Ardeniswan
		3. Henggar Hardiani
		4. Muhamad Farid Sidik
		5. M.S. Belgientie TRO
		6. Noor Rachmaniah
		7. Oges Susetio
		8. Sri Bimo Andy Putro
		9. Sunardi
		10. Oges Susetio

[3] Konseptor rancangan SNI
Andriantoro
Pusat Penelitian dan Pengembangan Kualitas dan Laboratorium Lingkungan
Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan

[4] Sekretariat pengelola Komtek perumus SNI
Pusat Standardisasi Lingkungan dan Kehutanan
Sekretariat Jenderal Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan
Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan